植 物 分 类 与 资 源 学 报 2013, 35 (4): 505 ~ 512
Plant Diversity and Resources DOI: 10.7677/ynzwyj201312178

青藏高原特有植物青海当归的谱系地理学初探*

张雪梅, 何兴金**
(四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610065)

摘要: 为探讨第四纪冰期气候波动对青藏高原多年生草本植物青海当归地理分布格局形成的影响, 检测了青海当归 16 个居群 147 个个体的核糖体内转录间隔区 (ITS) 的序列变异, 共发现了 7 个单倍型。结果表明除松潘居群外其余 15 个居群都拥有单倍型 H1, 青藏高原边缘的居群拥有 6 种 ITS 单倍型, 其中 5 种为私有单倍型。谱系关系分析显示单倍型 H1 为较古老的单倍型, AMOVA 分析表明, 居群间的变异占了总变异量的 67%, 居群遗传分化显著, 并且存在较明显的谱系地理结构 ($N_{ST}>G_{ST}$, $P<0.05$)。我们认为青海当归在第四纪冰期最大一次冰期来临时退缩到青藏高原边缘的避难所, 冰期后在扩张过程中经历了奠基者效应形成了如今的分布格局。

关键词: 青海当归; 谱系地理; 第四季; 奠基者效应; ITS
中图分类号: Q 948　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 2095-0845(2013)04-505-08

Phylogeography of *Angelica nitida* (Apiaceae), an endemic to the Qinghai-Tibet Plateau

ZHANG Xue-Mei, HE Xing-Jin**
(*Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education*, *College of Life Sciences*, *Sichuan University*, Chengdu 610065, China)

Abstract: In this study, we examined nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequence variation of *Angelica nitida*, a perennial plant species that is endemic to alpine scree in the Qinghai-Tibetan Plateau. Seven ITS haplotypes were detected among 147 individuals sampled across 16 populations. All populations except one (population SP) contained haplotype (H1). However, analysis of molecular variance (AMOVA) showed that ITS variation was mainly present among populations (67%) and that significant phylogeographical structure was evident ($N_{ST}>G_{ST}$, $P<0.05$). We inferred from our results that the current distribution pattern of *A. nitida* resulted from range retreats and expansions during the Quaternary. During Quaternary glaciations *A. nitida* retreated to refugia at the edge of the Qinghai-Tibet Plateau , but then expanded its range during interglacials and the current post-glacial period.

Key words: *Angelica nitida*; Phylogeography; Quaterary; Founder effect; ITS

植物对气候和环境变化的响应表现为改变其地理分布区或适应性进化 (Hallam, 1994; Etterson 和 Shaw, 2001)。而前人的研究则表明对现代生物类群的分布格局影响最大的是第四纪 (约 2 百万年前) 以来的气候变化 (Hewitt, 1996)。在第四纪冰期和间冰期的交互作用下, 青藏高原植被的变化不仅表现为植被类型的演替, 还表现为物种的迁移和分布区的变化 (Hewitt, 2001), 很多类群经历了迁移-扩张-再迁移-再扩张的过程, 而且这个过程极大地影响了物种的现代分布格局

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31070166, 31100161, 31270241) 国家基础条件平台项目教学标本子平台资助 (WEB: http://mnh.scu.edu.cn/)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: xjhe@scu.edu.cn
收稿日期: 2013-01-04, 2013-04-03 接受发表
作者简介: 张雪梅 (1982-) 女, 博士, 主要从事植物系统和分子进化研究。E-mail: zhangmei103127@sina.com

和遗传结构(Abbott 等, 2000; Petit 和 Grivet, 2002)。

被称为"世界屋脊"和"世界第三极"的青藏高原,也称为全球气候变化的"驱动机"和"放大器"(潘保田和李吉钧, 1996),是世界地质史上面积最大、海拔最高的高原(施雅风等, 1998)。最早且较为全面系统的阐述该地区谱系历史形成的研究是利用叶绿体 DNA 对高原台面和边缘的祁连圆柏的研究(Zhang 等, 2005)。近年来有关青藏高原及附近地区气候变迁与高山物种的谱系地理研究发展十分迅速,已有的研究发现,植物的地理分布格局往往反映出他们对过去冰期气候震荡的响应(张茜等, 2005; Meng 等, 2007; Chen 等, 2008; Yang 等, 2008; Wang 等, 2009a, b; Wu 等, 2010)。青藏高原的隆升以及第四纪冰期不仅对我国西部地区及东亚的气候、自然环境和生态造成了极大的影响(Zhang, 1983),而且对全球气候和环境变化等也产生了深刻作用(Raymo 和 Ruddiman, 1992)。因此研究该区域内物种的遗传结构和种群演化历史有助于理解该地区的地质和气候的演变历史(Hewitt, 2000)。

近年来核基因组的遗传信息也不断地用于推测物种谱系格局的研究(刘腾靓, 2009; 王晓雄等, 2011)。nrDNA 转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)具有进化速率较快、测序难度较小的特点,是研究较低分类阶元系统发育关系应用最为广泛的核基因分子标记之一(Baldwin 等, 1995),近年来已应用于推测物种谱系历史的研究。

青藏高原特有种青海当归(*Angelica nitida* Wolff)是典型的靠种子传播扩散的多年生草本,主要分布于四川西部、甘肃南部以及青海东部,生长于海拔 2 600 ~ 4 000 m 的高山草甸和灌丛中(Sheh 等, 2005)。前人研究表明青海当归在第三纪上新世才开始出现,其所在的青藏世系的演化过程与青藏高原的近代抬升有关(Liao 等, 2012)。本研究旨在通过对青海当归 147 个个体的 ITS 基因片段的测序分析来揭示该植物单倍型的地理分布式样、居群遗传结构等,进而推测其在第四纪冰期时可能的避难所和冰期后的迁移路线。

1 材料和方法

1.1 实验材料

研究材料采自四川西部、青海东部和甘肃南部,覆盖了该种的所有分布区。按居群采样标准对青海当归进行取样,即每个居群随机采样 4 ~ 11 个个体,且每个居群内采样个体之间至少间隔 20 m,共采集了青海当归 16 个居群 147 个个体(表 1, 图 1)。采集植物生长良好的幼叶,用硅胶快速干燥后带回实验室。凭证标本存于四川大学标本馆(SZ)。

表 1 青海当归 16 个居群材料来源及各居群单倍型的组成和个体数

Table 1 Origin, sample size, haplotypes and number of individuals per haplotype for the 16 sampled population of *Angelica nitida*

居群采样地 Populations	样本数 No.	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude/m	单倍型及相应个体数 Haplotypes (No. of individul)
岷县 (Gansu, Mixian) MX	10	104°33′	34°19′	2 600	H1(10)
碌曲 (Gansu, Luqu) LQ	7	102°4′	33°59′	3 875	H1(6) H3(1)
夏河 (Gansu, Xiahe) XH	10	102°31′	35°24′	3 155	H1(10)
榆中 (Gansu, Yuzhong) YZ	11	103°57′	35°46′	3 125	H1(3) H2(8)
门源 (Qinghai, Menyuan) MY	10	101°23′	37°28′	3 150	H1(10)
大通 (Qinghai, Datong) DT	11	101°34′	37°6′	3 100	H1(11)
泽库 (Qinghai, Zeku) ZK	10	101°27′	35°1′	3 512	H1(10)
河南 (Qinghai, Henan) HN	4	101°36′	34°44′	3 640	H1(4)
同德 (Qinghai, Tongde) TD	10	100°47′	34°43′	3 425	H1(9)
班玛 (Qinghai, Banma) BM	7	100°51′	32°32′	3 800	H1(7)
久治 (Qinghai, Jiuzhi) JZ	9	100°56′	33°31′	3 800	H1(8) H3(1)
红原 (Sichuan, Honyuan) HY	9	102°32′	32°47′	3 850	H1(7) H4(2)
瓦切 (Sichuan, Waqie) WQ	10	102°37′	33°7′	3 600	H1(8) H3(2)
唐克 (Sichuan, Tangke) TK	9	102°28′	33°24′	3 400	H1(6) H3(2) H5(1)
红星 (Sichuan, Hongxing) HX	10	102°44′	34°5′	3 200	H1(10)
松潘 (Sichuan, Songpan) SP	11	104°7′	32°34′	4 000	H6(10) H7(1)

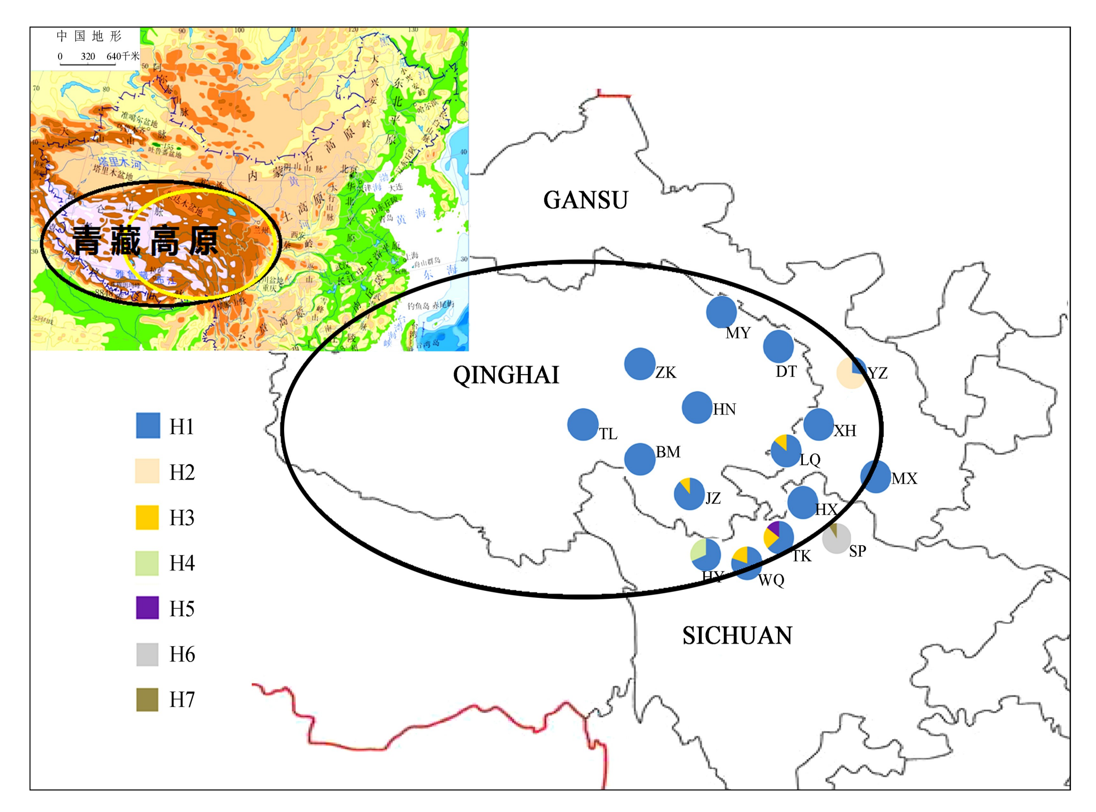


图 1　青海当归 ITS 单倍型在各居群中的分布图，居群简称见表 1

Fig. 1　Geographical distributions of haplotypes detected in *A. nitida* populations. Population names correspond to those listed in Table 1

1.2　DNA 提取和 PCR 扩增

采用改良的 CTAB 法（Doyle 和 Doyle，1987）提取总 DNA，用 ITS4 和 ITS5 通用引物（White 等，1990）对 nrDNA 的 ITS 片段进行 PCR 扩增。PCR 反应体系在 30 μL 体系中进行，包括模板 DNA10–40 ng，3 μL PCR 反应缓冲液，3 μL $MgCl_2$（25 mmol·L^{-1}），3 μL dNTP 混合液（10 mmol·L^{-1}），正反向引物各 1.5 μL（10 μL mol·L^{-1}），TaqDNA 聚合酶 0.3 单位（Tiangen，中国）。反应程序如下：94 ℃条件下变性 4 min，随后 94 ℃ 45 s，54 ℃ 45 s，72 ℃ 1 min，循环 35 次，最后在 72 ℃条件下延伸 7 min。扩增得到的 PCR 产物在 1% 的琼脂糖胶上电泳检测，送上海英俊测序公司测序。

1.3　数据分析

用 CLUSTAL_X（Jeanmougin 等，1998）软件对测定的 147 个个体的 ITS 全序列进行对位排列，并加以手工校对。用 DNASP5.0（Librado 和 Rozas，2009）确定单倍型。根据每个居群内不同单倍型的个体数目和总的个体数来计算单倍型频率，依照 Pons 和 Petit（1996）所描述的方法，用 PERMUT（available at http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/）软件计算居群内的遗传多样性 H_S 和居群间平均遗传多样性 H_T 以及居群遗传分化系数 G_{ST} 和 N_{ST}。居群间的 G_{ST} 和 N_{ST} 值用 1 000 次置换进行检验。应用 ARLEQUIN 软件包 version 3.1（Exeoffier 等，2006）中的 AMOVA（Analysis of Molecular Variance）计算居群内和居群间的遗传变异水平，以及单倍型分布的 F_{ST} 值（Weir 和 Cockerham，1984），以进一步分析居群的分化程度（1 000 次置换检验）。应用 Network 4.6.0.1（Polzin 和 Daneshmand，2003）对青海当归检测到的 16 个 ITS 单倍型进行基于简约性原则的中间连接网法分析（Median joining networks）（Bandelt 等，1999），并构建单倍型网状图。以峨眉当归（*Angelica omeiensis*）和长序当归（*Angelica longopes*）为外类群，用软件 BEAST 1.6.1（Drummond 和 Rambaut，2007）构建各单倍型的系统发育关系，模型为 GTR+I+G。物种水平上居群间的基因流（*Nm*）和 Tajima's *D*（Tajima，1989）及 Fu's F_S（Fu，1997）两种无限突变位点模型的中性检验方法检测及失配分析（Rogers 和 Harpending，1992）分别在软件 ARLEQUIN 和 DNASP5.0 中完成。失配分布分析主要用不同的单倍型之间的差异分布来评估区域范围内种群近期是否经历过扩张，当失配分布呈现为高低不齐或几何分布时，说明种群没有经历扩张；当失配分布呈现单峰钟形分布曲线，说明种群近期经历了扩张。我们还通过观察分布和期望分布之间的偏离总方差（sum of squared deviation，SSD）来检验种群扩张，当观察偏离总方差与期望偏离总方差没有显著性差异时，即 $P>0.05$，符合种群

扩张模型假设（Rogers，1995）。同时使用 Happending's Ragedness index（RAG）检验失配分布曲线的平滑度。

如果种群符合种群扩张模型，则利用公式：$\tau=2ut$ 来计算种群扩张的近似世代数 t（Rogers 和 Hapending，1992）。其中 u 是每条序列每代的突变率，通过 $u=2\mu kg$ 计算得到 u，μ 是每个碱基的突变率，k 是被分析序列的平均碱基数，g 代表物种每个世代所需时间。在本研究中，本文的 ITS 序列的平均碱基数为 600 bp，每个世代的时间保守估计为 3 年（根据我们在野外的观察和栽培），该种 ITS 基因的平均进化速率利用 Liao 等（2012）的分子钟数据用 Beast 和 Tracer 软件进行反推，得到的该种的 ITS 基因的平均进化速率为 3.5×10^{-9} s/s/y（95% 的置信区间为 $2.02-5.52\times10^{-9}$ s/s/y）。

2　结果

对青海当归的 16 个居群 147 个体的 nrITS 进行了 PCR 扩增片段的全序列测定。对位排列后，序列全长 604 bp，检测出 6 处变异位点（表 2），由软件 DNASP5.0 确定了 7 个 ITS 单倍型（H1–H7），单倍型在各居群的分布见图 1。在得到的 7 个单倍型中，单倍型 H1 分布最广，所占的比例最大（80.95%），除四川松潘居群外所有的青海当归居群都有单倍型 H1，且在每个居群中都为主要单倍型；单倍型 H3 分布于碌曲，久治，唐克，瓦切这 4 个居群中；其他 5 种单倍型都只分布在单个种群中，单倍型 H4，H5，H6，H7 则为青藏高原东南部居群的私有单倍型（表 1，图 1）。根据居群在青藏高原范围的具体地理位置，我们将青海当归的 16 个居群分为青藏高原边缘地区（岷县，松潘，红原，瓦切，唐克，红星，榆中，大通，门源）和青藏高原台面（泽库，河南，玛曲，久治，班玛，夏河，同德）不同的地理居群，青藏高原台面不具有任何的私有单倍型。在所研究的 16 个居群中，青藏高原东南部横断山区的居群（红原，瓦切，唐克，红星，松潘）拥有 6 种单倍型，其中唐克居群在所有居群中的遗传多样度最高（表 1，图 1）。

以峨眉当归（*Angelica omeiensis*）和长序当归（*Angelica longipes*）作为外类群，利用 BEAST 的 Bayes 方法构建的青海当归单倍型的系统树如图 2A，结果表明青海当归的 7 个单倍型形成 3 个分支，青藏高原东南部的红原和唐克居群的两个私有单倍型 H4 和 H5 形成一个分支，位于系统树的基部；松潘居群的 2 个私有单倍型 H6 和 H7 分支与其他剩余单倍型（H1，H2 和 H3）分支构成姐妹群。

AMOVA 分析结果（表 3）表明，青海当归在居群间的变异（67%）高于居群内的变异（33%），居群间存在显著遗传分化（$F_{ST}=0.67$，$P<0.001$），居群间的平均基因流 N_m 为 0.245。通过 PERMUT2 程序计算得出，居群内平均遗传多样性 H_S（±*se*）、总的遗传多样性 H_T（±*se*）、居群间遗传分化 G_{ST}（±*se*）和 N_{ST}（±*se*）分别为：0.152(±0.0489)，0.317(±0.1146)，0.521(±0.0287)，0.638(±0.1681)，U 统计检验显示，N_{ST} 显著大于 G_{ST}（$P<0.05$），表明青海当归亲缘关系相近的单倍型在相同或相近的居群中发生，表现出明显的谱系地理结构。通过 Network 软件构建的网状进化树显示 7 种单倍型之间的系统关系见图 2B。单倍型 H1 处于网络树的中心，可能是较为古老的单倍型。

ITS 单倍型碱基变异的失配分布分析表明，

表 2　青海当归 7 种单倍型的变异位点及个体数

Table 2　Variable sites of the aligned sequences of ITS fragment in the 7 haplotypes of *A. nitida*

单倍型 Haplotypes	变异位点 Variable sites						个体数 No. of individual
	55	255	257	402	551	587	
H1	A	G	G	G	C	T	119
H2	A	G	T	G	C	T	8
H3	A	T	G	G	C	T	6
H4	G	G	G	G	C	T	2
H5	G	G	G	A	C	T	1
H6	A	G	G	G	A	C	10
H7	A	G	G	G	C	C	1

单倍型之间成对碱基差异出现的观察频率与期望频率趋势相似，呈明显的单峰分布（图 3），失配分布的偏离总方差（SSD）和平滑度（RAG）指数（P>0.05）都支持青海当归居群经历过快速的居群扩张，中性检验（Tajima's D、Fu's F_S）不显著（P>0.05）（表 4），但 AMOVA 分析结果表明有效种群大小变化范围（θ_0 to θ_1）非常高（表 4），所以本文认为青海当归种群经历了扩张。利用当归属 ITS 的进化速率推算得到的青海当归居群扩张的时间为 0.138 百万年前。

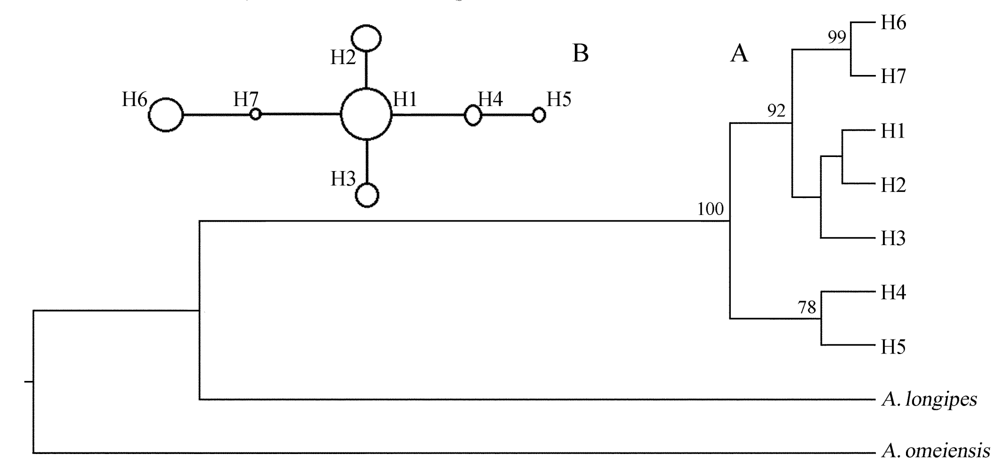


图 2　A. 基于青海当归 7 个 ITS 单倍型构建的系统发育关系树，分支上的数字分别表示贝叶斯后验概率（BPP）；B. 青海当归 7 个 ITS 单倍型的网状关系树，树中圆圈的大小代表单倍型频率

Fig. 2　A. Phylogenetic relationships of haplotypes in *A. nitida*: Values below branches (%) represent the Bayesian PP values; B. Network of haplotypes: sizes of circles in the network are proportional to the observed frequencies of haplotypes

表 3　青海当归 16 个居群的分子遗传变异分析

Table 3　Hierarchical analyses of molecular variance (AMOVA) based on ITS of *A. nitida*

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	总方差 Sum of squares	变异成分 Variance components	变异比例 Percentage of variation/%	固定指数 Fixation index (F_{ST})
居群间 Among populations	15	25.422	0.1755	67.00	
居群内 Within populations	132	11.326	0.0865	33.00	F_{ST}: 0.67
总计 Total	147	36.748	0.2620		

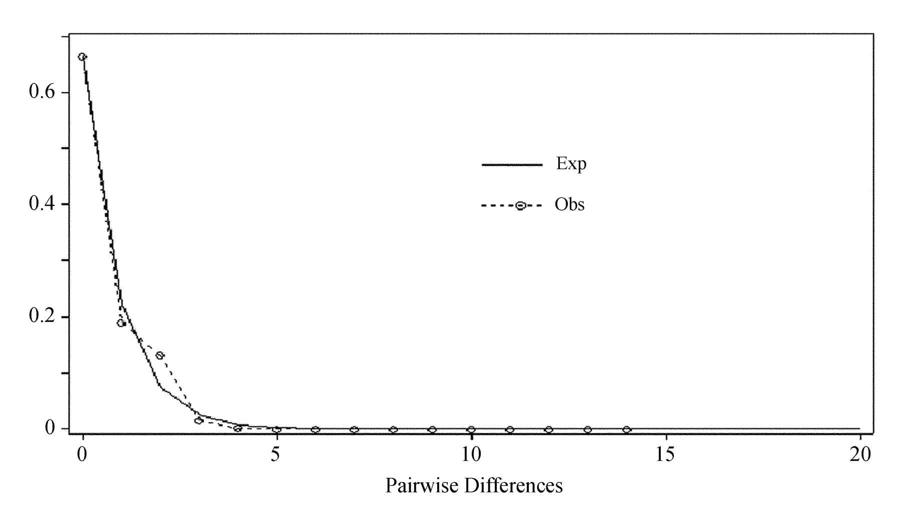


图 3　青海当归所有个体 nrDNA ITS 片段数据的失配分析

Fig. 3　Mismatch distributions of ITS sequences of *A. nitida*. The dashed line shows observed values, whereas the solid line represents expected values under a model of sudden (stepwise) population expansion

表4 青海当归种群扩张的中性检测

Table 4 Estimates of neutrality tests and expansion time of *A. nitida*

Group	τ	θ_0	θ_1	SSD (*P* value)	RAG (*P* value)	Tajima's *D* (*P* value)	Fu's F_S (*P* value)	Expansion time(mya)
Total	3.5	0	99999	0.00431 (0.5412)	0.24044 (0.5268)	−1.12977 (0.1288)	−3.35349 (0.06160)	0.138

τ：种群群爆发以后经过几代的时间；θ_0：种群爆发前的种群大小；θ_1：种群爆发后的种群大小；RAG：the Hapending's Raggedness 指数；SSD：偏离总方差；Tajima's *D*、Fu's F_S：中性检验指数；Expansiontime（mya）：种群扩张时间（百万年前）

τ, time in number of generations elapsed since the sudden expansion episode; θ_0 and θ_1 are pre-expansion and post-expansion populations size; RAG, the Harpending's Raggedness index; SSD, sum of squared deviations

3 讨论

本文的研究表明青海当归ITS单倍型在其地理分布区存在明显的谱系地理格局。Qiu等（2011）结合前人的研究，总结出青藏高原植物居群扩张的模式大致存在以下两种情况，一是植物遵循“冰期生境收缩，冰期后扩张的模式（Hewitt, 2000）。青藏高原边缘低海拔的地区成为物种在冰期的避难所，并保留了祖先单倍型，而在青藏高原台面上则只能检测到少数几种单倍型；二是在第四纪冰期，植物在青藏高原台面上仍有部分居群存活下来并且保留了部分祖先单倍型，青藏高原台面的局部地区成为避难所，从而在高原面上有多种单倍型。青海当归的单倍型分布情况更倾向于第一种情况，青藏高原东南部的居群（红原，瓦切，红星，唐克，松潘）有着较高的遗传变异和单倍型特有性。许多研究表明一个物种的遗传多样性在冰期避难所与间冰期扩散的居群间会存在差异，避难所的居群往往具有更高的遗传多样性，而扩散地区的居群遗传多样性相对较低，这是因为当物种在间冰期从避难所向外扩张时，伴随着奠基者效应，居群可能会受到一系列瓶颈作用的影响，从而使得迁移后的居群遗传多样性降低（Avise，2000；Petit等，2003）。同时，Petit认为在避难所地区的居群，不仅有高的遗传变异，而且有单倍型的特有性（Petit等, 2003）。因此我们的研究结果表明青藏高原东南部的横断山区很可能是青海当归在第四纪冰期的避难所。高原台面的居群都具有古老的单倍型H1，序列变异少，一种可能是由于青海当归种群在冰期后扩张的过程中经历了奠基者效应，现存于高原台面的青海当归种群起源于第四纪冰期存在于高原东南部避难所种群，种群共同经历了一次冰期后的回迁，在回迁过程中有优势的单倍型H1的个体首先占领青藏高原适宜的生存环境，并不断扩大其分布范围，奠基者效应使得所有的种群都拥有相同的单倍型H1；另一种可能是现存于高原台面的这些种群是第四纪冰期后的残余种群，即高原台面分布的种群在冰期原地保留，瓶颈作用造成了种群内遗传变异的减少。但根据遗传漂变对单倍型的随机选择，高原台面的种群应该固定几种不同的单倍型，并且单倍型频率也会有显著的不同，种群间的遗传变异较大。然而我们的研究结果表明，这种模式在高原台面是不存在的，高原台面几个种群间的遗传分化非常小，因此，“高原台面分布的青海当归种群在冰期原地保留”是不可能的。而青藏高原东南部的地形为其充当青海当归第四纪冰期的避难所也提供了有利条件，当冰川来临时，秦岭、云贵高原和大巴山像屏障一样削弱了冰川的作用，同时由于四川盆地内陆与云贵高原温暖多雨的气候的影响，西部南北走向的河谷以及大小盆地为该地区植物迁移和保存提供了有利环境，也成为了许多植物的冰期“避难所”（吴征镒，1980；Yang等, 2012）。第四纪冰期被划分为4个阶段：Xixiabangma（1.17–0.80百万年前）、Naynayxungla（0.72–0.50百万年前）、Guxiang（0.30–0.13百万年前）和Baiyu（0.01–0.07百万年前），在第二次冰期Naynayxungla（0.72–0.50百万年前）以后，冰川就变得不是很广泛和强烈了（Zheng等, 2002），青海当归种群扩张的时间大约是在0.138百万年前，扩张的时间在第二次大冰期以后，这就说明随着冰川的减弱、青藏高原气候的好转和温度的回升，青海当归扩张了种群的范围。

在青海当归居群中，AMOVA结果显示居群

间的遗传分化为 0.67。结果表明青海当归种内变异主要来自于居群间的遗传分化，尤其是青藏高原东南部边缘居群间的遗传变异。位于青藏高原东南缘的松潘和唐克等居群都有各自的私有单倍型，而松潘居群与其他居群没有任何共享单倍型，这可能是由于生境的片段化所引起的。青藏高原的边缘存在一系列的高山和峡谷，它们直接影响了青海当归的种子扩散范围，阻隔了居群之间的基因流，所以导致了青海当归在该地区遗传分化较大。松潘居群两个特有单倍型的形成有可能是由于岷山的隆起成为了居群间基因交流的屏障，该居群的个体在适应高海拔环境的过程中衍生出了新的单倍型。

综上所述，青海当归所有居群 nrDNA ITS 序列变异研究的结果表明，该物种冰期的避难所在青藏高原东南部边缘，青海当归种群的遗传变异也主要发生在避难所地区，而高原台面上经历了共同的回迁和随后的奠基者效应，因而在它回迁地区的居群拥有共同的单倍型 H1，且遗传变异比较单一。

〔参 考 文 献〕

刘腾靓, 2009. 西藏沙棘的谱系地理学研究［D］. 兰州大学, 硕士毕业论文

施雅风, 李吉均, 李炳元, 1998. 青藏高原晚新生代隆升与环境变化［M］. 广州: 科技出版社

吴征镒, 1980. 中国植被［M］. 北京: 科学出版社

Abbott RJ, Smith LC, Milne RI, 2000. Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic［J］. *Science*, **289**: 1343—1346

Avise JC, 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*［M］. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press

Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM *et al.*, 1995. The ITS region of nuelear ribosomal DNA: avaluable source of evidence on angiosperm phylogeny［J］. *Annals of the Missouri Botanieal Garden*, **82**: 247—277

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies［J］. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 37—48

Chen SY, Wu GL, Zhang DJ *et al.*, 2008. Molecular phylogeography of alpine plant *Metagentiana striata* (Gentianaceae)［J］. *Journal of Systematics and Evolution*, **46** (4): 573—585

Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue［J］. *Phytochem Bull*, **19**: 11—15

Drummond AJ, Rambaut A, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees［J］. *BMC Evolutionary Biology*, **7**: 214. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-7-214

Exeoffier L, Laval G, Schneider S, 2006. Arlequin version 3.1 Available from http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/

Etterson JR, Shaw R, 2001. Constraint to adaptive evolution in response to global warming［J］. *Science*, **294**: 151—154

Fu YX, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection［J］. *Genetics*, **147**: 915—925

Hallam A, 1994. *An outline of Phanerozoic Biogeography*［M］. Oxford: Oxford University Press, 1—246

Hewitt GM, 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation［J］. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**: 247—276

Hewitt G, 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages［J］. *Nature*, **405**: 907—913

Hewitt GM, 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time［J］. *Molecular and Evolution*, **10**: 537—549

Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M *et al.*, 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X［J］. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**: 403—405

Liao CY, Downie SR, Yu Y *et al.*, 2012. Historical biogeography of the Angelica group (Apiaceae tribe Selineae) inferred from analyses of nrDNA and cpDNA sequences［J］. *Journal of Systematics and Evolution*, **50** (3): 206—217

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data［J］. *Bioinformatics*, **25**: 1451—1452

Meng LH, Yang R, Abbott RJ *et al.*, 2007. Mitochondrial and chloroplast phylogeography of *Picea crassifolia* Kom. (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent highlands［J］. *Molecular Ecology*, **16**: 4128—4137

Pan BT (潘保田), Li JJ (李吉均), 1996. Qinghai-Tibetan plateau: A driver and amplifier of the global climatic change［J］. *Journal of Lanzhou University* (Natural Sciences) (兰州大学学报·自然科学版), **32** (1): 108—115

Petit RJ, Grivet D, 2002. Optimal randomization strategies when testing the existence of a Phylogeographic strueture［J］. *Geneties*, **161**: 469—471

Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu JL *et al.*, 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity［J］. *Science*, **300**: 1563—1565

Polzin T, Daneshmand SV, 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs［J］. *Operations Research Letters*, **31**: 12—20

Pons O, Petit RJ, 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles［J］. *Genetics*, **144**: 1237—1245

Qiu YX, Fu CX, Hans PC, 2011. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: Tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **59**: 225—244

Raymo ME, Ruddiman WF, 1992. Tectonic forcing of late Cenozoic climate [J]. *Nature*, **359**: 117—122

Rogers AR, Harpending H, 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 552—569

Rogers A, 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion [J]. *Evolution*, **49**: 608—615

Sheh ML, Pu FT, Pan ZH *et al.*, 2005. Apiaceae (Umbelliferae) [A]. *Flora of China* Vol. 14 [M]. Beijing: Science Press, 60—74

Stehlik I, Sehneller JJ, Bachmann K, 2001. Resistance or emigration: response of the high-apline Plant *Eritriehium nanum* (L.) Gaudin to the ice age within the Central Alps [J]. *Molecular Ecology*, **10**: 357—370

Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, **7**: 381—397

Wang LY, Abbott RJ, Zheng W *et al.*, 2009a. History and evolution of alpine plants endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau: *Aconitum gymnandrum* (Ranunculaceae) [J]. *Molecular Ecology*, **18**: 709—721

Wang LY, Hiroshi I, Liu TL *et al.*, 2009b. Repeated range expansion and glacial endurance of *Potentilla glabra* (Rosaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*. Available online at www. jipb. net

Wang XX (王晓雄), Yue JP (乐霁培), Sun H (孙航) *et al.*, 2011. Phylogeographical study on *Eriophyton wallichii* (Labiatae) from alpine scree of Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **33** (6): 605—614

Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, **38**: 1358—1370

White TJ, Bruns T, Lee S *et al.*, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ *et al* (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application* [M]. San Diego, California: Academic Press, 315—322

Wu LL, Cui XK, Richard IM *et al.*, 2010. Multiple autopolyploidizations and range expansion of *Allium przewalskianum* Regel. (Alliaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Molecular Ecology*, **19**: 1691—1704

Yang FS, Li YF, Ding X *et al.*, 2008. Extensive population expansion of *Pedicularis longiflora* (Orobanchaceae) on the Qinghai-Tibetan Plateau and its correlation with the Quaternary climate change [J]. *Molecular Ecology*, **17**: 5135—5145

Yang ZY, Yi TS, Pan YZ *et al.*, 2012. Phylogeography of an alpine plant *Ligularia vellerea* (Asteraceae) in the Hengduan Mountains [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **50** (4): 316—324

Zhang XS, 1983. The Tibetan Plateau in relation to the vegetation of China [J]. *Annals of Missouri Botanieal Garden*, **70**: 564—570

Zhang Q (张茜), Yang R (杨瑞), Wang Q (王钦) *et al.*, 2005. Phylogeography of *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from the chloroplast DNA *trn*T-*trn*F sequence variation [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **43** (6): 503—512

Zheng B, Xu Q, Shen Y, 2002. The relationship beween climate change and Quaternary glacial cycles on the Qinghai-Tibet Plateau: review and speculation [J]. *Quaternary International*, **97-98**: 93—101